

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C12Q 1/48</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/56919</b> (43) Date de publication internationale: 28 septembre 2000 (28.09.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00658</p> <p>(22) Date de dépôt international: 17 mars 2000 (17.03.00)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 99/03434 19 mars 1999 (19.03.99) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMIS-SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MARECHAL, Eric [FR/FR]; 24, chemin des Toumelles, F-38000 Grenoble (FR). BLOCK, Maryse [FR/FR]; 2, allée des Roses, F-38640 Claix (FR). JOYARD, Jacques [FR/FR]; 10, allée de Lapiat, F-38240 Meylan (FR). DOUCE, Roland [FR/FR]; 5, rue du Palenka, F-38000 Grenoble (FR).</p> <p>(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	

(54) Title: SCREENING METHOD INVOLVING MGDG SYNTHASE

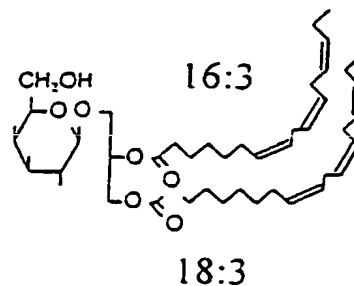
(54) Titre: PROCEDE DE CRIBLAGE METTANT EN JEU LA MGDG SYNTHASE

## (57) Abstract

The invention concerns a method for screening and selecting parasiticides (apicomplex phylum parasites) and/or herbicides and the uses thereof. Said method consists in incubating a substance to be tested with a MGDG synthase and measuring the specific enzymatic activity, after said incubation. The invention also concerns the use of MGDG synthase or a plant isolated plastid membrane for selecting or screening the products inhibiting the activity of the MGDG synthase, capable of being used as active principles against apicomplex parasites and/or of being used as herbicides.

## (57) Abrégé

Procédé de criblage et de sélection d'antiparasitaires (parasites du phylum des apicomplexes) et/ou d'herbicides et ses applications. Ledit procédé comprend: l'incubation d'une substance à tester avec une MGDG synthase et la mesure de l'activité spécifique enzymatique, après ladite incubation. L'invention concerne également l'utilisation d'une MGDG synthase ou d'une membrane plastidiale isolée de plante, pour la sélection ou le criblage de produits inhibiteurs de l'activité de la MGDG synthase, aptes à servir de principes actifs contre les parasites apicomplexes et/ou aptes à servir d'herbicides.



### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**PROCEDE DE CRIBLAGE METTANT EN JEU LA MGDG SYNTHASE**

La présente invention est relative à un procédé de criblage et de sélection d'antiparasitaires (parasites du phylum des apicomplexes) et/ou d'herbicides.

Les apicomplexes sont des parasites unicellulaires responsables de maladies parmi les plus graves pour l'espèce humaine : le paludisme, la première maladie mortelle dans le monde, et la toxoplasmose, une des deux infections opportunistes les plus fréquentes chez les malades du SIDA. Ces maladies infectieuses progressent alors qu'aucun traitement ne permet aujourd'hui d'éradiquer les parasites qui les provoquent : *Plasmodium* qui se niche dans les cellules hépatiques et les globules rouges des malades du paludisme, et *Toxoplasma* qui envahit entre autre le cerveau des malades de la toxoplasmose.

En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le paludisme touche plus de 500 millions d'êtres humains et provoque 2,5 millions de morts par an. Le paludisme tue la moitié des enfants de moins de 5 ans en Afrique. 40 % de la population mondiale se trouve dans des zones impaludées, et ces zones progressent chaque année. Les traitements pesticides ont provoqué la résistance des moustiques vecteurs du parasite (les anophèles), et le parasite lui-même (4 espèces de *Plasmodium*, dont *Plasmodium falciparum* pour 95 % des cas) résiste de plus en plus aux traitements connus (en particulier les dérivés des chloroquines). Selon les estimations, le paludisme est la première ou la deuxième (après les diarrhées) maladie mortelle dans le monde. Le coût direct et indirect du paludisme en Afrique est passé de 800 millions de dollars en 1987 à plus de 2 milliards de dollars en 1998. La résistance aux traitements, et la progression des zones impaludées font de ce fléau un enjeu majeur du XXI siècle.

Selon le *National Institute of Health* (NIH), la toxoplasmose est la première infection cérébrale chez les malades du SIDA. Le parasite (*Toxoplasma gondii*) est commun et l'on peut considérer qu'une personne sur

deux a été infectée, soit en mangeant de la viande mal cuite, soit au contact de chats domestiques. La toxoplasmose n'est grave que chez les personnes fragiles, en particulier les fœtus humains et les malades du SIDA. Dans le cas du SIDA, les patients présentant un taux en  $CD4^+ < 100/mm^3$  développent les symptômes de la toxoplasmose, en général par réactivation d'une infection antérieure. Les traitements connus (les plus communs sulfadiazine et pyriméthamine, mais aussi clindamycine, azithromycine, clarithromycine, dapsonne et atavaquone), doivent parfois être prescrits indéfiniment car bien que létales pour le parasite *in vitro*, ces substances n'éliminent pas toujours le parasite de l'organisme. Ces traitements étant parfois incompatibles avec la trithérapie, la prophylaxie est difficile. Dans le combat qu'il reste à mener contre le SIDA, il est donc fondamental de rechercher de nouveaux traitements susceptibles d'éradiquer *Toxoplasma*.

D'autres apicomplexes tels que ceux du genre *Eimeria*, sont responsables de la coccidiose chez les oiseaux et les bovins.

Depuis peu, l'on sait que ces parasites présentent des structures subcellulaires végétales (McFadden et al., *Nature*, 1996, **384**, 482 ; Köhler et al., *Science*, 1997, **275**, 1485-1489), dénommées apicoplastes.

Ces Auteurs ont identifié par hybridation *in-situ*, le plaste qui contient un ADN de 35 kb chez *Toxoplasma gondii* : c'est un organe limité par 4 membranes, proche dans l'évolution de celui des algues vertes. Très vite, ce plaste a été présenté comme une faille des parasites apicomplexes (Fichera et Roos, *Nature*, 1996, **390**, 407-409). Ces Auteurs ont en particulier montré que certains antibiotiques, tels que les fluoroquinolones et les macrolides inhibent les ADN gyrases procaryotes et bloquent la réplication de cet ADN de 35 kb, qui semble nécessaire à la survie du parasite. Plus récemment, Waller et al. (PNAS, 1998, **95**, 12352-12357) ont montré que ce plaste contenait une protéine connue pour synthétiser les acides gras dans les chloroplastes végétaux, l'acyl-carrier-protéine ou ACP. Le précurseur de l'ACP contient une séquence de transit de type chloroplastique, qui permet à la protéine (l'ACP mature, ou un marqueur fluorescent de type GFP fusionné

avec la séquence de transit du précurseur de l'ACP) d'être intégrée dans le plaste du parasite.

L'ACP n'est malheureusement pas spécifique du règne végétal, et on la trouve chez les bactéries, en particulier du tractus intestinal. Elle ne constitue donc pas une cible spécifique pour un médicament qui n'affecterait que les apicomplexes parasitant l'organisme.

Les Inventeurs se sont donc donnés pour but de pourvoir à une cible spécifique des parasites apicomplexes, pour sélectionner de nouveaux médicaments efficaces contre lesdits parasites apicomplexes.

Ils ont maintenant trouvé que la MGDG synthase (enzyme capitale pour la biogénèse de l'enveloppe des plastes) peut être une cible de choix pour des principes actifs contre *Plasmodium* (paludisme), *Toxoplasma* (toxoplasmose) et *Eimeria* (coccidiose) et pour des herbicides.

En effet, le MGDG (monogalactosyldiacylglycérol, figure 1) est connu dans tous les plastes analysés à ce jour : il est le lipide le plus abondant des membranes plastidiales ( > 50 % des glycérolipides), vital à la biogénèse des plastes et à la survie des cellules, et n'existe pas dans les autres systèmes membranaires, en particulier dans les cellules animales (Douce, Science, 1974, 183, 852-853) ; sa biosynthèse est catalysée dans l'enveloppe par une UDP-galactose:1,2-diacylglycérol 3-β-D-galactosyltransférase (EC 2.4.1.46) appelée aussi MGDG synthase, selon la réaction suivante :

$$1,2\text{-diacylglycérol} + \text{UDP-galactose} \rightarrow \text{UDP} + 1,2\text{-diacyl-3-O-}\beta\text{-D-galactopyranosyl-sn-glycérol}.$$

La présente invention a pour objet l'utilisation d'une MGDG synthase pour la sélection ou le criblage de produits inhibiteurs de l'activité de la MGDG synthase, aptes à servir de principes actifs contre les parasites apicomplexes et notamment ceux responsables du paludisme, de la toxoplasmose et de la coccidiose.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une membrane plastidiale isolée de plante, pour la sélection ou le criblage

de produits inhibiteurs de l'activité de la MGDG synthase, aptes à servir de principes actifs contre les parasites apicomplexes et notamment ceux responsables du paludisme, de la toxoplasmose et de la coccidiose.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une MGDG synthase pour la sélection ou le criblage de produits inhibiteurs de l'activité de la MGDG synthase, aptes à servir d'herbicides.

La présente invention a, en outre, pour objet l'utilisation d'une membrane plastidiale isolée de plante, pour la sélection ou le criblage de produits inhibiteurs de l'activité de la MGDG synthase, aptes à servir d'herbicides.

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage et de sélection d'antiparasitaires apicomplexes et/ou d'herbicides, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'incubation d'une substance à tester avec une MGDG synthase et
- la mesure de l'activité spécifique enzymatique, après ladite incubation.

On définit l'inhibition de l'activité enzymatique par la diminution de l'activité d'au moins 50 %, comme un pourcentage de l'activité contrôle (activité de l'enzyme traitée comme l'essai, mais en l'absence d'inhibiteur).

Conformément à l'invention, ladite MGDG synthase présente une activité spécifique initiale comprise de préférence entre 0,1 et 120  $\mu$ mol de galactose incorporé/h/mg de protéine ; certaines MGDG synthases recombinantes peuvent présenter une activité spécifique supérieure à 120  $\mu$ mol de galactose incorporé/h/mg de protéine.

Egalement, conformément à l'invention, la MGDG synthase est d'origine végétale (épinard, concombre ou Arabidopsis, notamment) et est sélectionnée dans le groupe constitué par les MGDG synthase A et les MGDG synthase B purifiées ou recombinantes.



Conformément audit procédé, l'incubation MGDG synthase/substance à tester est réalisée dans un milieu d'incubation contenant un tampon ajusté à un pH compris entre 6 et 9 (MOPS-NaOH, Tris-HCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , CAPS de 10 à 250 mM), en présence de détergents (CHAPS de 3 à 6 Mm ou LDAO), d'un agent réducteur (DTT 1-10 mM ou  $\beta$ -mercaptoéthanol), de phosphatidylglycérol (0,1-2 mM) et d'un sel (KCl ou NaCl, 10-300 mM) ; de préférence, ledit tampon contient 50 mM de MOPS-NaOH, pH 7,8, 4,5 mM de CHAPS, 1,3 mM de phosphatidylglycérol, 1 mM de DTT, 250 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 250 mM de KCl.

Également conformément à l'invention, l'activité enzymatique de la MGDG synthase est mesurée après constitution de micelles, conformément à la méthode décrite dans Maréchal et al. (*J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 5788-5798).

Conformément à l'invention, ledit parasite apicomplexe est sélectionné dans le groupe constitué par *Plasmodium*, *Toxoplasma* et *Eimeria*.

La présente invention a également pour objet, l'utilisation d'un inhibiteur de la MGDG synthase, sélectionné conformément à la méthode définie ci-dessus, pour l'obtention d'un médicament antiparasitaire.

La présente invention a en outre pour objet, l'utilisation d'un inhibiteur de la MGDG synthase, sélectionné conformément à la méthode définie ci-dessus, comme herbicide.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente le MGDG (monogalactosyldiacylglycérol) ;

- la figure 2 est une comparaison de la MGDG synthase d'épinard, de concombre et d'*Arabidopsis* ; la figure 2A correspond à une comparaison des séquences en amino acides déduites des ADNc codant

pour les différentes MGDG synthases ; dans cette figure atMGD A et atMGD B correspondent à des séquences issues d'*Arabidopsis thaliana*, csMGD A correspond à une séquence issue de *Cucumis sativa* et soMGD A correspond à une séquence issue de *Spinacia oleracea*. \* et : représentent des symboles  
5 respectivement pour les amino acides identiques et les substitutions conservées ; h1 à h7 correspondent à 7 hélices- $\alpha$  putatives ; la figure 2B représente un arbre phylogénique des MGDG synthases matures ;

- la figure 3 correspond à l'identification du produit de la réaction de la rMGD A ; la figure 3A : séparation des lipides polaires par chromatographie en couche mince bi-dimensionnelle ; dans cette figure MGDG =  
10 monogalactosyldiacylglycérol ; DGDG = digalactosyldiacylglycérol ; TGDG = trigalactosyldiacylglycérol ; SL = sulfolipide ; PC = phosphatidylcholine ; PG = phosphatidylglycérol ; la figure 3B correspond à l'analyse des galactolipides synthétisés *in vitro* par la rMGD A ;

15 - la figure 4 illustre la localisation de la rMGD A dans *E. coli* ;  
- la figure 5 correspond à la purification partielle de la rMGD A ; figure 5A : fractionnement par chromatographie hydroxyapatite-agarose ; figure 5B : analyse en SDS-Page de la fraction éluée à partir de la colonne hydroxyapatite-agarose.

20 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

### **Exemple 1 : Préparation d'une MGDG synthase, à partir d'une plante.**

On solubilise et on purifie la MGDG synthase à partir de  
25 l'enveloppe des chloroplastes d'épinard, dans les conditions exposées dans Maréchal et al. (C.R. Acad. Sci. Paris, 1991, 313, III, 521-528 ; *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 8, 5788-5798 ; *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 11, 5714-5722).

Concrètement :

- on purifie les membranes d'enveloppe des chloroplastes  
30 d'épinard (voir Maréchal et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, précité).

On peut également obtenir les membranes d'enveloppe, conformément à la technique suivante : de manière plus précise, toutes les opérations sont réalisées à 0°-5°C. Les chloroplastes sont obtenus à partir de 3-4 kg de feuilles d'épinard (*Spinacia oleracea* L.) et purifiés par centrifugation isopycnique, à l'aide de gradients de Percoll. Les chloroplastes intacts purifiés sont lysés dans un milieu hypotonique et les membranes d'enveloppe sont purifiées à partir du lysat par centrifugation en gradient de saccharose.

Les membranes d'enveloppes obtenues sont stockées sous azote liquide, dans un milieu comprenant 50 mM de MOPS-NaOH, pH 7,8 et 1 mM de DTT (dithiothréitol).

- on solubilise et on purifie la MGDG synthase à partir des membranes d'enveloppe obtenues, comme précisé ci-dessus (voir Maréchal et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, précité).

On peut également obtenir de la MGDG synthase, à partir du concombre (Demande JP 10014579 au nom de Kirin Brewery Co. Ltd).

Dans le cadre de la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, il est préférable d'utiliser une MGDG synthase présentant au moins une activité spécifique de 0,1  $\mu$ mol de galactose incorporé/h/mg de protéine.

## **Exemple 2 : Préparation d'une MGDG synthase recombinante et constructions pour sa surexpression dans *E. coli*.**

1) Clonage et surexpression d'une MGDG de classe A dans *E. coli*.

- Clonage de l'ADNc de MGDG synthase :

Un fragment de 1647 pb correspondant à la protéine mature de l'ADNc de MGDG de concombre (Shimojima et al., 1997) est utilisé comme sonde pour cribler une banque  $\lambda$ gt11 obtenue à partir de feuilles d'épinard.

Avant le criblage, la présence d'un ARNm homologue est vérifiée par *Northern blot* à partir d'ARN total de feuilles d'épinard. 320 000 plaques sont cultivées sur *E. coli* Y1090 et transférées sur des membranes

Hybond-N<sup>+</sup>. Les membranes sont préhybridées pendant 2h à 60°C dans une solution comprenant 2 x SSC, 5 x Denhardt's, 0,5 % SDS (w/v) et de l'ADN de sperme de saumon (0,1 mg.ml<sup>-1</sup>).

5 L'hybridation est réalisée pendant 16h à 60°C dans le même réactif en présence d'1 ng d'ADN de concombre marqué au [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP. Les membranes sont lavées 3 fois 3 min à température ambiante dans du 2 x SSC, 0,1 % SDS (w/v) et 2 fois 15 min à 55°C, puis autoradiographiées.

Deux clones positifs sont ensuite purifiés par 3 niveaux de criblage. L'ADN de phage est extrait et digéré avec *EcoRI* ou *EcoRI* et  
10 *BamHI*. Les deux inserts d'ADNc sont sous-clonés dans le plasmide pBlueScript SK+ (digéré par *EcoRI* ou digéré par *EcoRI*-*BamHI*), pour le séquençage.

L'analyse du fragment de restriction et le séquençage montrent que les deux clones correspondent au même ADNc.

15 L'amplification par PCR avec des amorces adjacentes au site de clonage  $\lambda$ gt11 révèle des inserts de 2,5 et 0,9 kb, respectivement. L'analyse de la séquence des inserts obtenus par PCR montre que l'insert de 0,9 kb est identique à l'extrémité 3' de l'insert de 2,5 kb.

En conséquence, l'insert le plus long est coupé à l'aide des  
20 enzymes de restriction *BamHI/EcoRI*, sous-cloné dans le plasmide pBlueScript SK+ (Stratagene) et séquençé.

La séquence obtenue, qui comprend 1851 nucléotides semble être une chimère. Elle contient une séquence de 807 nucléotides qui présente une homologie élevée avec l'extrémité codante en 3' de l'ADNc de  
25 la MGDG synthase de concombre, incluant le codon stop. Cet ADN tronqué est fusionné à son extrémité 5' avec une séquence d'ADN partielle (1044 nucléotides), homologue à des  $\beta$ -endoglucanases. L'extrémité 5' de l'ADNc de MGDG synthase est clonée par amplification rapide des extrémités d'ADNc (RACE) à l'aide du kit d'amplification Marathon (Clontech).

30 L'ADNc de feuilles d'épinard est préparé à partir d'ARNm polyA<sup>+</sup> et utilisé comme matrice pour les amplifications PCR de l'extrémité 5'

de l'ADNc de MGDG synthase, conformément aux instructions du fabricant. La spécificité de la réaction est due à l'amorce spécifique CTCATTTGAAGGGCAGTAGCACC (nucléotides 870 à 848) (SEQ ID NO:1) et par la PCR " hot start ".

5 Cette méthode permet de cloner un fragment de 1001 pb qui est ensuite sous-cloné dans le plasmide pBlueScript SK+ et séquencé sur les 2 brins dans 3 clones indépendants, de manière à être sûr que la Taq polymérase n'introduit aucune erreur.

Le fragment 5' RACE inclut un codon d'initiation identifiable et  
10 131 nucléotides de la séquence en 5' non traduite. Le clone comprenant l'ADNc complet de la MGDG synthase est généré à partir de l'ADNc de feuilles d'épinard par PCR, en utilisant des amorces spécifiques des extrémités 3' et 5' de l'ADNc. L'amorce sens est la suivante : CACACAATATTTCCAATGTATACCCAC (nucléotides -82 à -57) (SEQ ID  
15 NO:2).

L'amorce anti-sens est la suivante :  
GATTATCATTTCCCCTCGCCCTGCC (nucléotides 1672 à 1648) (SEQ ID  
NO:3).

Le fragment d'ADN obtenu de 1765 pb est sous-cloné dans le  
20 plasmide pBlueScript SK+ au niveau du site de restriction *SmaI* et la séquence est vérifiée.

La séquence d'ADNc est plus petite que le transcrit (2,5 kb) détectée par une analyse en *Northern blot*, indiquant ainsi qu'elle n'est pas complète.

25 Les 2 techniques combinées (technique 5'-RACE et criblage d'une banque d'ADNc d'épinard) permettent d'obtenir une séquence de 1890 pb, qui inclut un cadre ouvert de lecture de 1569 pb, qui code pour une protéine de 522 acides aminés (57,5 kDa) (figure 2), qui appartient à la famille des MGDG synthases A.

30 L'analyse de la séquence en acides aminés montre que cette MGDG synthase A contient plus de résidus non polaires (56 %) que polaires

(44 %), 9 résidus cystéine et 16 résidus histidine qui pourraient être impliqués dans la chélation des métaux ; cette protéine présente un point isoélectrique basique ( $pI = 9,16$ ).

## 2) Extraction

5 . extraction de la MGDG synthase recombinante (rMGD A)

toutes les opérations sont réalisées à 4°C. Un culot de bactéries recombinantes (34 mg de protéine), exprimant la MGDG synthase (7 mg de protéine) est remis en suspension dans 50 ml de milieu A (6 mM de CHAPS, 50 mM de MOPS-NaOH, pH 7,8, 1 mM de DTT) contenant 50 mM  
10 de  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  et un mélange d'inhibiteurs de protéases (1 mM de PMSF ; 1 mM de benzamidine ; 0,5 mM d'acide caproïque). Après une lyse cellulaire par sonication répétée, la suspension est mélangée à 0°C dans de la glace) pendant 30 minutes. Le mélange est centrifugé pendant 15 min. à 243 000xg (Beckman L2, rotor SW 40). Le surnageant contenant les pro-  
15 téines solubilisées (16 mg) est chargé sur une colonne (Pharmacia C10/20, 25 ml de gel) hydroxyapatite-ultrogel (IBF-France), équilibrée avec un milieu A contenant 50 mM de  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ . Les protéines sont éluées, en utilisant un gradient de  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  (50-275 mM) (dans un milieu A ; débit : 30 ml/h ; volume des fractions : 1,5ml). La MGDG synthase recombinante est  
20 éluee à 275 mM de  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ .

3) Surexpression de la MGDG synthase d'épinard dans *E. coli*

### - Matériel et méthodes

Deux formes matures de MGDG synthase sont surexprimées  
25 dans *E. coli*, en utilisant le plasmide pET-15b (Novagen) et un plasmide, dénommé pET-Y 3a, qui permet de surmonter le problème dû au fait que la séquence déduite de la MGDG synthase contient 22 résidus arginine, parmi lesquels 17 sont codés par AGG ou AGA, codons qui sont en fait peu utilisés chez *E. coli*. En effet, pET-Y 3a a été construit en insérant dans le plasmide  
30 pET-3a (Novagen), le gène arg U (ou DNA Y) codant pour l'ARN de transfert de l'arginine associé aux codons rares AGA/AGG.

Ces deux plasmides sont linéarisés avec *Bam*HI et *Nde*I. Les fragments amplifiés par PCR sont générés à partir du clone d'ADNc complet. Le plasmide pET-15 est ligaturé avec un fragment codant les 417 résidus C-terminaux de l'enzyme, qui est amplifié par PCR à l'aide des amorces suivantes :

Amorce sens : GGAGCATATGGGGGGTGAGTGATAATG (SEQ ID NO:4)

et

Amorce anti-sens : GTTCTGGATCCTCAAGCAGCACAAGAGT (SEQ ID NO:5)

et digéré par les enzymes *Bam*HI et *Nde*I.

Un autre fragment digéré par les enzymes *Bam*HI et *Nde*I, est amplifié par PCR, à l'aides des amorces suivantes :

Amorce sens : CTTCACATATGCTTAATTCCGGGGAGAG (SEQ ID NO:6)

et

Amorce anti-sens : GTTCTGGATCCTCAAGCAGCACCGAGTA (SEQ ID NO:7),

codant les 424 résidus C-terminaux de l'enzyme, est sous-cloné au niveau du site de restriction *Bam*HI- *Nde*I du plasmide pET-Y3.

La première construction permet l'expression d'une protéine de fusion étiquetée histidine (*h*MGD A), comprenant 437 résidus (48,24 kDa). La seconde construction permet l'expression d'une protéine de 425 acides aminés (*r*MGD A), incluant une méthionine d'initiation additionnelle, correspondant au codon ATG du site de restriction *Bam*HI. Les protéines recombinantes sont exprimées dans *E. coli* BL21(DE3). Les cultures bactériennes sont cultivées à 37°C, sous agitation vigoureuse (Certomat, 250 rpm), jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,4 à 0,6. L'expression de la MGDG synthase recombinante est induite par l'addition de 0,4 mM d'IPTG dans le milieu et les cultures sont incubées 3 h à 25°C. Les bactéries sont rassemblées en culot par centrifugation (Eppendorf, 14000 x g, 10 min), et solubilisées dans un tampon A (MOPS 50 mM, pH 7,8, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, benzamidine 1 mM, PMSF 1 mM et acide caproïque 0,5 mM) en présence ou

en l'absence de Triton X-100 0,1 % ou dans un tampon A avec de l'urée 6M. Les fractions solubles et insolubles sont séparées par centrifugation (Airfuge, 115 000 x g, 15 min) et analysées sur SDS-PAGE (gel de polyacrylamide à 12 %). Les protéines sont détectées par une coloration au bleu de  
5 Coomassie.

L'hMGD est purifiée à homogénéité à partir des bactéries par chromatographie d'affinité à base d'un métal (NTA, Novagen), suivie d'un désalage à travers une colonne PD10 (Pharmacia), équilibrée dans un mélange comprenant de l'imidazole 5 mM, du NaCl 0,5 mM, du Tris-HCl 20  
10 mM, pH 7,9, en présence d'urée 6M.

La protéine recombinante pure (1 mg) est utilisée pour obtenir un anticorps polyclonal de lapin (Eurogentec, Belgique). L'IgG est purifiée par chromatographie DEA-trisacryle M (IBF, France).

#### - Résultats

15 Afin de minimiser l'effet de l'extrémité N-terminale de la séquence cible de chloroplaste, l'ADNc d'épinard est exprimé à partir du résidu leucine 99, qui correspond au site de clivage putatif du peptide signal du précurseur de la MGD A de concombre (Shimojima et al., PNAS, 1997, **94**, 333-337).

20 En utilisant de l'UDP-[<sup>14</sup>C]-gal comme substrat, on peut mesurer l'activité de la MGDG synthase dans les extraits d'*E. coli* exprimant la rMGD A, après induction par IPTG : plus de 2 µmol de galactose sont incorporées/h/mg de protéine. L'activité déterminée dans les extraits d'*E. coli* contenant la protéine étiquetée à l'histidine hMGD A est du même ordre (1,3  
25 µmol de galactose incorporé/h/mg de protéine).

Seulement une fraction négligeable de [<sup>14</sup>C]-galactose (moins de 0,1µmol de galactose incorporé/h/mg de protéine) est observée dans les lipides d'*E. coli* avant l'induction par IPTG. De plus, aucune incorporation de [<sup>14</sup>C]-galactose n'est observée dans les bactéries contrôles, exprimant E37,  
30 une autre protéine d'enveloppe interne (Teyssier et al., Plant J., 1996, **10**, 903-912). Après 3 h d'induction par IPTG, un extrait d'*E. coli* contenant la



MGD A surexprimée est incubé en présence d'UDP-[<sup>14</sup>C]-gal et les lipides sont extraits, pour analyser les produits de la réaction.

L'extrait lipidique est analysé par chromatographie en couche mince bi-dimensionnelle, en même temps que les lipides d'enveloppe ajoutés au mélange comme standard (Douce et al., *In Methods in Plant Biochemistry, Lipids, Membranes and Aspects of Photobiology* (Harwood et al. eds, 1990, 4, 71-103, Academic Press, Londres). La figure 3A montre qu'une seule tache radioactive co-migre avec le MGDG d'origine et est détectée par autoradiographie. Une caractérisation plus poussée du MGDG a été faite par l'analyse des groupes polaires par chromatographie papier bi-dimensionnelle ; dans ce cas là également, une seule tache radioactive est détectée par autoradiographie et co-migre avec le glycéryl-galactose obtenu après désacylation du MGDG d'enveloppe par hydrolyse alcaline douce (figure 3B).

Ces résultats montrent que le produit formé dans *E. coli* est effectivement du MGDG, qui est normalement absent dans les membranes d'*E. coli*. Aucun autre lipide contenant du galactose n'est formé, contrairement à ce que l'on observe après incubation de membranes d'enveloppe isolées, en présence d'UDP-[<sup>14</sup>C]-gal.

L'activité MGDG synthase est catalysée par une famille multigénique de protéines.

Grâce à des fractions protéiques membranaires très enrichies, le mécanisme biréactionnel de l'activité MGDG synthase a été étudié ainsi que sa sélectivité pour différentes espèces moléculaires de 1,2-diacylglycérol (Maréchal et al., *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 5788-5798). Certaines propriétés structurales du site catalytique ont été élucidées : l'existence d'acides aminés importants pour la catalyse (Cys, His, Lys) et l'association de l'enzyme à des métaux bivalents (Maréchal et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 5714-5722). La masse moléculaire fonctionnelle au cours de l'inactivation de la MGDG synthase a par ailleurs été déterminée par irradiation gamma : la masse moléculaire apparente de la MGDG synthase de l'enveloppe est de 97 ± 5 kDa. Le polypeptide MGDG synthase mature ayant une taille voisine de

45 kDa en gel dénaturant, il est probable que dans l'enveloppe, la MGDG synthase soit sous forme dimérique. Une masse moléculaire fonctionnelle de  $114 \pm 12$  kDa a aussi été déduite par la même technique pour la MGDG synthase A recombinante purifiée. Ce résultat suggère que les MGDG synthases sont vraisemblablement des homodimères.

**Exemple 3 : Mesure de l'activité enzymatique, à partir de micelles.**

L'activité de la MGDG synthase, est effectuée sur différents types d'échantillons, selon le modèle choisi : membrane plastidiale, fractions membranaires d'*E. coli* surexprimant une MGDG synthase recombinante (rMGD A, 0,7 µg protéine/test, enzyme préalablement extraite à partir d'une plante (voir exemple1).

. préparation des micelles

1,3 mM de phosphatidylglycérol (PG) et 160 µM de diacylglycérol (DAG) sont dissous dans du chloroforme. Après évaporation du solvant sous argon, 200 µl de milieu d'incubation contenant 50 mM de MOPS-NaOH, pH 7,8, 4,5 mM de CHAPS, 1 mM de DTT, 250 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 250 mM de KCl sont ajoutés et le milieu est vigoureusement mélangé, de manière à remettre en suspension les lipides. 100 µl de fractions contenant la MGDG synthase, dans le milieu d'incubation, sont introduites, puis le milieu est à nouveau vigoureusement mélangé, puis maintenu 1 h à 20°C.

Cette procédure permet d'obtenir des micelles, conformément à Maréchal et al., 1994, précité.

. réaction enzymatique

La réaction dans le mélange d'incubation est alors initiée par l'addition d'1 mM d'UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]gal (37 Bq/µmol). Après 10 min. à 1 h, la réaction est stoppée par l'addition d'un mélange chloroforme/ méthanol (1 :2, v/v), les lipides sont extraits conformément à la méthode de Bligh et al (Can. J. Biochem. Physiol, 1959, 37, 911-917) et la radioactivité des galactolipides marqués est déterminée par comptage en scintillation liquide comme décrit

dans Covès et al. (FEBS lett., 1986, 208, 401-406). L'activité est exprimée en  $\mu\text{mol}$  de galactose incorporé/h/mg de protéine.

Dans un échantillon riche en MGDG synthase, on peut obtenir une activité spécifique élevée, c'est-à-dire jusqu'à 115-120  $\mu\text{mol}$  de galactose incorporé/h/mg de protéine, et même plus.

### 3) activité spécifique de la rMGD A soluble surexprimée

Lorsque l'on analyse l'expression de la MGDG synthase d'épinard dans *E. coli*, on observe que la plupart de la protéine (rMGD A) est insoluble et que des détergents (6 mM de CHAPS ou 1 % de Triton X-100) ne solubilisent que partiellement la protéine (figure 4). Par contre, presque toute la protéine surexprimée est solubilisée par de l'urée, indiquant que la plus grande partie de la MGDG synthase est présente dans des corps d'inclusion (figure 4). Dans cette fraction, l'activité de la MGDG synthase est très faible (0,03  $\mu\text{mol}$  de galactose incorporé/h/mg de protéine). En fait, l'analyse par chromatographie d'hydroxyapatite des fractions d'*E. coli* solubilisées par le CHAPS montre que seulement une petite fraction (environ 0,1 %) de la protéine recombinante synthétisée par la bactérie est active. Les conditions expérimentales utilisées sont les mêmes que celles utilisées pour la MGDG synthase d'enveloppe (voir ci-dessus).

A la figure 4, l'expression de rMGD A est induite par 0,4 mM d'IPTG comme précisé dans Matériel et méthodes ci-dessus.

La plupart (50 à 80 %) de l'activité chargée par le haut de la colonne est retrouvée dans un pic étroit, élué avec du phosphate 275 mM (figure 5A). Dans ce pic, l'activité spécifique de la MGDG synthase est très élevée : 115  $\mu\text{mol}$  de galactose incorporé/h/mg de protéine.

L'analyse des polypeptides présents dans les différentes fractions montre qu'un polypeptide de 45 kDa, correspondant à la rMGD A, est présent dans les fractions actives, mais également dans le volume mort, dans lequel la plupart de la protéine est présente sous une forme inactive (figure 5B). Ceci montre que seulement une fraction (1 %) de la protéine solubilisée par le CHAPS est effectivement active.

Dans cette figure 5B, 20  $\mu$ l de fraction éluée à partir de la colonne hydroxyapatite sont analysés par SDS-PAGE (gel de polyacrylamide à 12 %) ; les protéines sont détectées par coloration au bleu de Coomassie ; Ch : échantillon chargé par le haut de la colonne ; 15, 30, etc... : fractions éluées à partir de la colonne ; MW : marqueur de poids moléculaire (Biorad) ; la rMGD A est indiquée par une flèche et la rMGD A active se trouve uniquement dans les fractions 67 à 71.

**Exemple 4 : Comparaison des propriétés biochimiques de la MGD A surexprimée avec la MGDG synthase d'enveloppe de chloroplaste**

L'analyse de l'activité de la MGDG synthase partiellement purifiée de chloroplastes de feuilles d'épinard (Maréchal et al., J. Biol. Chem., 1995, **270**, 5714-5722) a démontré que le DTT peut protéger l'activité de l'enzyme de l'oxydation et que le N-éthylmaléimide (NEM) et l'ortho-phénanthroline sont des inhibiteurs puissants de l'enzyme.

La MGDG synthase d'épinard surexprimée présente les mêmes propriétés.

La rMGD A, purifiée par chromatographie d'hydroxyapatite est très active en présence de DTT. Si le DTT est éliminé par chromatographie sur une colonne Biogel P6-DG, la MGDG synthase perd 85 % de son activité, alors que l'addition de DTT maintient son activité.

Les fractions de rMGD A partiellement purifiée sont désalées par chromatographie sur une colonne (Pharmacia, colonne C10/40, 30 ml de gel) Biogel P6-DG (Bio-Rad), équilibrée sans DTT. Des aliquots (200  $\mu$ l) des fractions sont incubés pendant 40 min à 25°C sous agitation douce en présence ou en l'absence de DTT. L'activité de galactosylation est alors mesurée comme précisé ci-dessus (voir exemple 3).

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau I ci-après :

Tableau I

Fraction purifiée sur hydroxyapatite	Activité (%)
Non désalée	100
Désalée	15
Désalée + DTT 1 mM	75
Désalée + DTT 10 mM	65

5 L'activité est exprimée comme un pourcentage de l'activité contrôle (non désalée).

Le Tableau II montre que la *m*MGD A est très sensible au NEM et qu'une protection de l'activité est obtenue par préincubation en présence de DAG et/ou de PG.

10

Tableau II

Préincubation (30 min)	Incubation +/- NEM 150 $\mu$ M (10 min)	Incubation +/- DTT 10 mM (10 min)	Réaction enzymatique	Activité (%)
DTT	-	-	+PG+DAG+UDP-gal	100
-	-	+	+PG+DAG+UDP-gal	101
-	-	-	+PG+DAG+UDP-gal	37
-	+	+	+PG+DAG+UDP-gal	35
DTT	+	-	+PG+DAG+UDP-gal	108
UDP-gal	+	+	+PG+DAG	32
PG	+	+	+DAG+UDP-gal	56
PG+DAG	+	+	+UDP-gal	60

Pour obtenir les résultats résumés dans le Tableau II, la *m*MGD A est désalée par chromatographie sur une colonne (Pharmacia, colonne C10/40, 30 ml de gel) Biogel P6-DG (Bio-Rad), équilibrée sans DTT.

15 Des aliquots (200  $\mu$ l) des fractions sont incubés pendant 30 min à 25°C sous agitation douce, suivie d'une incubation de 10 min. en présence ou en l'absence de NEM 150  $\mu$ M, puis d'une incubation de 10 min en présence ou en l'absence de DTT. L'activité de galactosylation est alors mesurée comme précisé ci-dessus (voir exemple 3).

L'activité est exprimée comme un pourcentage de l'activité contrôle, c'est-à-dire après incubation pendant 50 min. en présence de DTT 10 mM.

On observe également la *m*MGD surexprimée est inhibée par l'agent chélateur hydrophobe *ortho*-phénanthroline, comme le montre le Tableau III ci-après :

Tableau III

Conditions	Autres additions	Activité (%)
Activité initiale (temps 0)	-	100
Sans <i>ortho</i> -phénanthroline	-	82
	PG	87
	PG + DAG	78
	UDP-gal	72
Avec <i>ortho</i> -phénanthroline	-	43
	PG	27
	PG + DAG	92
	UDP-gal	17

L'inactivation de la *m*MGD A par l'*ortho*-phénanthroline est bloquée par le DAG, mais n'est pas affectée par l'UDP-gal.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'une MGDG synthase pour la sélection ou le criblage de produits inhibiteurs de l'activité de la MGDG synthase, aptes à servir de principes actifs contre les parasites apicomplexes.

5 2°) Utilisation d'une membrane plastidiale isolée de plante, pour la sélection ou le criblage de produits inhibiteurs de l'activité de la MGDG synthase, aptes à servir de principes actifs contre les parasites apicomplexes.

10 3°) Utilisation d'une MGDG synthase pour la sélection ou le criblage de produits inhibiteurs de l'activité de la MGDG synthase, aptes à servir d'herbicides.

4°) Utilisation d'une membrane plastidiale isolée de plante, pour la sélection ou le criblage de produits inhibiteurs de l'activité de la MGDG synthase, aptes à servir d'herbicides.

15 5°) Procédé de criblage et de sélection d'antiparasitaires et/ou d'herbicides, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'incubation d'une substance à tester avec une MGDG synthase et

20 - la mesure de l'activité spécifique enzymatique, après ladite incubation.

6°) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite MGDG synthase présente de préférence une activité spécifique initiale comprise entre 0,1 et 120  $\mu$ mol de galactose incorporé/h/mg de protéine.

25 7°) Procédé selon la revendication 5 ou la revendication 6, caractérisé en ce que l'incubation MGDG synthase/substance à tester est réalisée dans un milieu d'incubation contenant un tampon ajusté à un pH compris entre 6 et 9, en présence de détergents, d'un agent réducteur, de phosphatidylglycérol et d'un sel.

30 8°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit milieu d'incubation contient de préférence 50 mM de MOPS-NaOH, pH

7,8, 4,5 mM de CHAPS, 1 mM de DTT, 1,3 mM de phosphatidylglycérol, 250 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 250 mM de KCl.

9°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisés en ce que la MGDG synthase est d'origine végétale et est sélectionnée dans le groupe constitué par les MGDG synthase A et les MGDG synthase B purifiées ou recombinantes.

10°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisés en ce que ledit parasite apicomplexe est sélectionné dans le groupe constitué par *Plasmodium*, *Toxoplasma* et *Eimeria*.

11°) Utilisation d'un inhibiteur de la MGDG synthase, sélectionné conformément au procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, pour l'obtention d'un médicament antiparasitaire apicomplexe.

12°) Utilisation d'un inhibiteur de la MGDG synthase, sélectionné conformément au procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, comme herbicide.



1/5

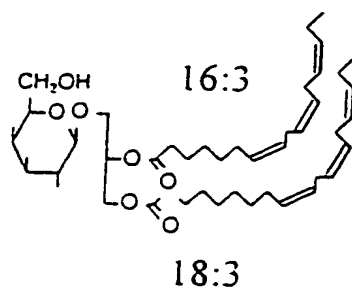


FIGURE 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A

2 / 5

[illegible]

B

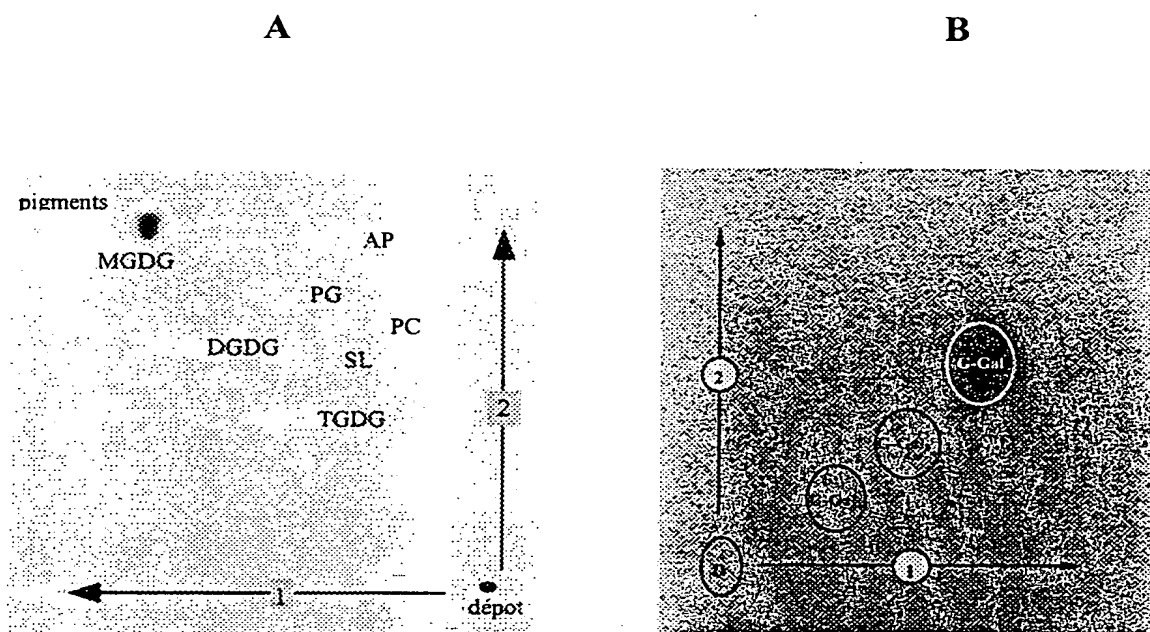
76346

	somMGD A
	csMGD A
	atMGD A
	atMGD B

**FIGURE 2**

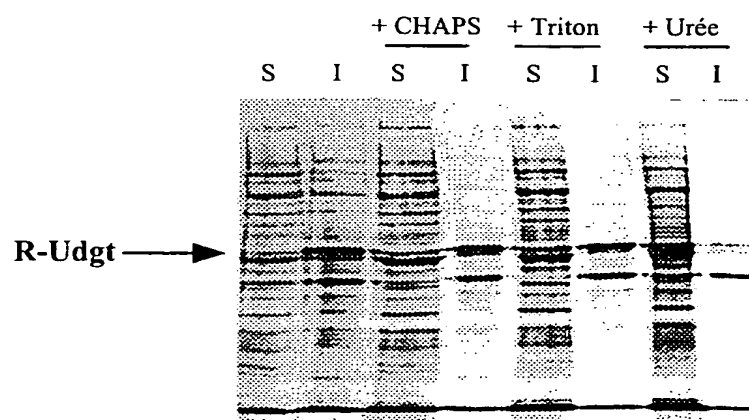
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/5

**FIGURE 3**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

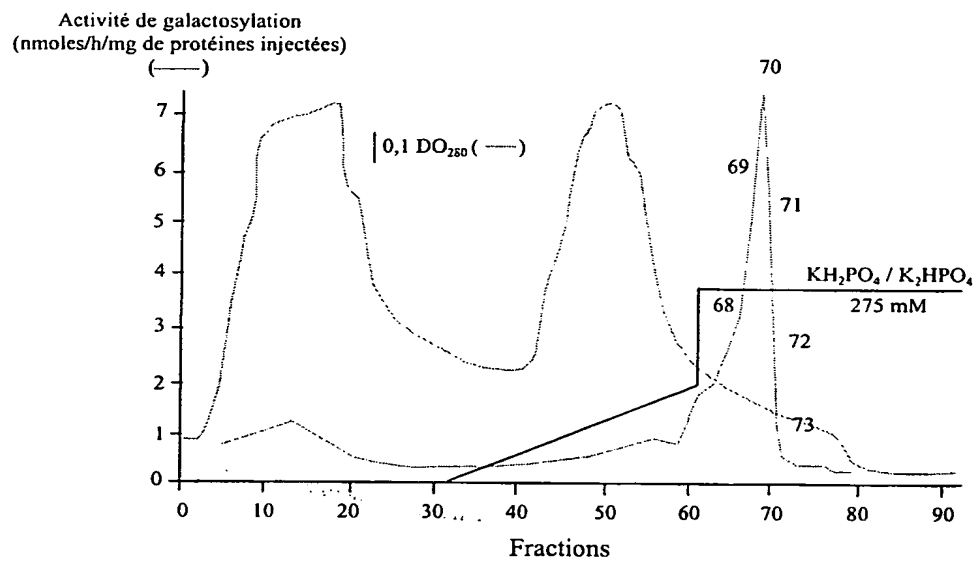
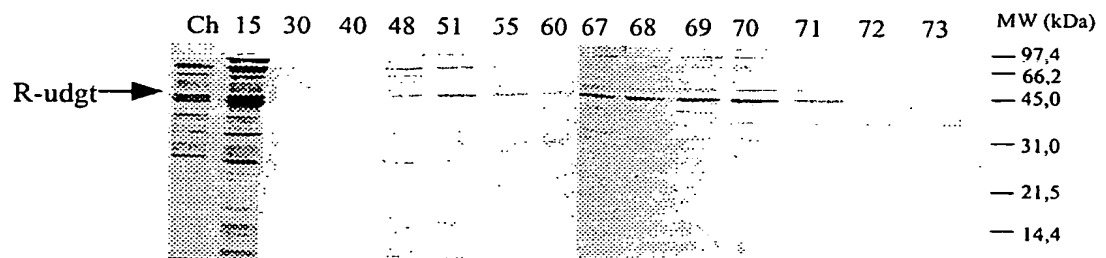
4/5

**FIGURE 4**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



5/5

**FIGURE 5A****FIGURE 5B**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
MARECHAL Eric  
BLOCK Maryse  
JOYARD Jacques  
DOUCE Roland

<120> PROCEDE DE CRIBLAGE ET DE SELECTION D'ANTIPARASITAIRES  
APICOMPLEXES ET/OU D'HERBICIDES ET SES APPLICATIONS.

<130> BLOcp263/54P

<140>  
<141>

<160> 7

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Spinacia oleracea

<400> 1  
ctcattttgaa gggcagtagc acc 23

<210> 2  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Spinacia oleracea

<400> 2  
cacacaatat ttccaatgta taccac 27

<210> 3  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Spinacia oleracea

<400> 3  
gattatcatt tcccctcgcc ctgcc 25

<210> 4  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Spinacia oleracea

<400> 4  
ggagcatatg ggggtgagtg ataatg 26

<210> 5  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Spinacia oleracea

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<400> 5  
gttctggatc ctcaagcagc acaagagt 28

<210> 6  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Spinacia oleracea

<400> 6  
cttcacatat gcttaattcc ggggagag 28

<210> 7  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Spinacia oleracea

<400> 7  
gttctggatc ctcaagcagc accgagta 28

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00658

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>E MARÉCHAL, C MIÈGE, M A BLOCK, R DOUCE, J JOYARD: "The Catalytic Site of Monogalactosyldiacylglycerol Synthase from Spinach Chloroplast Envelope Membranes" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 11, 17 March 1995 (1995-03-17), pages 5714-5722, XP002123831 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 July 2000

Date of mailing of the international search report

01/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00658

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>E MARÉCHAL, M A BLOCK, J JOYARD, R DOUCE:            "Kinetic Properties of            Monogalactosyldiacylglycerol Synthase from            Spinach Chloroplast Envelope Membranes"            JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,            vol. 269, no. 8,            25 February 1994 (1994-02-25), pages            5788-5798, XP002123832            cited in the application            the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-12
A	<p>MCFADDEN G I ET AL: "PLASTID IN HUMAN            PARASITES"            NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON,            vol. 381, page 482 XP002057546            ISSN: 0028-0836            cited in the application            the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-12
A	<p>M SHIMOJIMA, H OHTA, A IWAMATSU, T MASUDA,            Y SHIOI, K-I TAKAMIYA: "Cloning of the            gene for monogalactosyldiacylglycerol            synthase and its evolutionary origin"            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF            SCIENCES OF USA,            vol. 94, January 1997 (1997-01), pages            333-337, XP002123833            cited in the application            page 333</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-12



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den e Internationale No

PCT/FR 00/00658

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12Q1/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>E MARÉCHAL, C MIÈGE, M A BLOCK, R DOUCE, J JOYARD: "The Catalytic Site of Monogalactosyldiacylglycerol Synthase from Spinach Chloroplast Envelope Membranes" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 11, 17 mars 1995 (1995-03-17), pages 5714-5722, XP002123831 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 juillet 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/08/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hart-Davis, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den = Internationale No

PCT/FR 00/00658

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>E MARÉCHAL, M A BLOCK, J JOYARD, R DOUCE:            "Kinetic Properties of            Monogalactosyldiacylglycerol Synthase from            Spinach Chloroplast Envelope Membranes"            JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,            vol. 269, no. 8,            25 février 1994 (1994-02-25), pages            5788-5798, XP002123832            cité dans la demande            le document en entier</p> <p>---</p>	1-12
A	<p>MCFADDEN G I ET AL: "PLASTID IN HUMAN            PARASITES"            NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON,            vol. 381, page 482 XP002057546            ISSN: 0028-0836            cité dans la demande            le document en entier</p> <p>---</p>	1-12
A	<p>M SHIMOJIMA, H OHTA, A IWAMATSU, T MASUDA,            Y SHIOI, K-I TAKAMIYA: "Cloning of the            gene for monogalactosyldiacylglycerol            synthase and its evolutionary origin"            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF            SCIENCES OF USA,            vol. 94, janvier 1997 (1997-01), pages            333-337, XP002123833            cité dans la demande            page 333</p> <p>-----</p>	1-12